

07 JUN 2005

(12)特許協力条約に基づいて公開された国

(19)世界知的所有権機関  
国際事務局(43)国際公開日  
2004年7月1日 (01.07.2004)

PCT

(10)国際公開番号  
WO 2004/054520 A1(51)国際特許分類<sup>7</sup>:  
35/78, A61P 17/00, 43/00

A61K 7/00, 7/48,

山市 久米川町1-52-14 株式会社ニチレイ バイオサイ  
エンス開発センター内 Tokyo (JP).

(21)国際出願番号:

PCT/JP2003/015656

(74)代理人: 酒井一, 外(SAKAI,Hajime et al.); 〒102-  
0083 東京都千代田区麹町5丁目7番地 秀和紀尾井  
町TBRビル Tokyo (JP).

(22)国際出願日: 2003年12月8日 (08.12.2003)

(25)国際出願の言語:

日本語

(26)国際公開の言語:

日本語

(30)優先権データ:  
特願 2002-362507

2002年12月13日 (13.12.2002) JP

(81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE,  
DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,  
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,  
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,  
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,  
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式  
会社ニチレイ (NICHIREI CORPORATION) [JP/JP];  
〒104-8402 東京都中央区築地6丁目19番20号  
Tokyo (JP).(84)指定国(広域): ARIPO特許 (BW, GH, GM, KE, LS,  
MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特  
許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッ  
パ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,  
TR), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72)発明者; および

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 永峰 賢一  
(NAGAMINE, Kenichi) [JP/JP]; 〒189-0003 東京都東  
村山市久米川町1-52-14 株式会社ニチレイ バイ  
オサイエンス開発センター内 Tokyo (JP). 林 美希  
(HAYASHI, Miki) [JP/JP]; 〒189-0003 東京都東村山  
市久米川町1-52-14 株式会社ニチレイ バイオサイ  
エンス開発センター内 Tokyo (JP). 山崎 かおり  
(YAMASAKI, Kaori) [JP/JP]; 〒189-0003 東京都東村添付公開書類:  
— 国際調査報告書2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

WO 2004/054520 A1

(54) Title: WHITENING AGENT, SKIN PREPARATION FOR EXTERNAL USE AND COSMETIC

(54)発明の名称: 美白剤、皮膚外用剤及び化粧料

(57) Abstract: It is intended to provide a whitening agent having a whitening effect and a high safety and being usable in cosmetics, etc. wherein camucamu seeds having been disposed so far can be efficaciously utilized, and a skin preparation for external use or a cosmetic containing the whitening agent, etc. This whitening agent contains a camucamu seed extract as the active ingredient and the skin preparation for external use or the cosmetic as described above contains this whitening agent, etc.

(57)要約: 従来、廃棄処理されていたカムカム種子の有効利用が可能となり、安全性に優れ、化粧料等に利用可能な美白作用を有する美白剤、該美白剤等を配合した皮膚外用剤又は化粧料を提供すること。本発明の美白剤は、カムカム種子の抽出物を有効成分として含み、本発明の皮膚外用剤又は化粧料は、前記美白剤等を含む。

## 明細書

### 美白剤、皮膚外用剤及び化粧料

#### 技術分野

本発明は、カムカム種子の抽出物を有効成分とする美白剤、これを用いた皮膚外用剤及び化粧料に関する。

#### 背景技術

近年、化粧品業界や食料品業界においては、動物由来原料への人体に及ぼす不安や規制が強まり、植物由来原料への関心が一層高まりつつある。また、生体外から取り込まれたり、生体内で発生する活性酸素等の酸化反応の影響による老化促進や、紫外線による皮膚の着色や発ガン作用の問題も深刻になってきている。

例えば、化粧料や食料品の製造、加工又は貯蔵・保存中において、各種素材中に含まれる油脂類が空気中の酸素によって酸化及び過酸化されることが問題となってきている。とりわけ、油脂中に含まれるリノール酸、リノレン酸等の不飽和脂肪酸は、空気中の酸素により容易に過酸化されて、過酸化脂質やフリーラジカルを生成し、更には発癌性物質をも生成することが知られている。このような酸化及び過酸化が起こると、製品が着色、変色、変性、異臭等の外的変化或いは栄養価や有効性の低下等の質的変化が生じる。更に変性が進むと毒物の生成等が起り製品そのものの品質の劣化を招く。

そこで、前述の不飽和脂肪酸の酸化及び過酸化を抑制し、品質の劣化を防止する為に従来から種々の抗酸化剤が用いられている。抗酸化剤は、酸化の際に生ずるペルオキシドラジカルに作用し、酸化の連鎖反応を停止させるか、若しくはフリーラジカルに作用し、酸化反応を停止させる。このような抗酸化剤としては、例えば、ブチルヒドロキシアニソール(BHA)、ブチルヒドロキシトルエン(BHT)等の合成抗酸化剤が一般的に用いられている。しかし、近年、合成抗酸化剤の使用量が増えるにつれて、人体への影響及び安全性が問題にされ、消費者の拒否反応が強くなっている。更に、これらの合成抗酸化剤は、油溶性の為に水溶液への使用が困難である。

一方、安全性の高い天然物由来の抗酸化剤としては、例えば、天然ビタミンE( $\alpha$ -トコフェロール)やビタミンC等が知られている。しかし、これら天然物由来の抗酸化剤は、極端な脂溶性又は水溶性という両極の性質を有している為、その利用には自と限度が生じる。また、その活性が長時間安定的に持続しない等の欠点もある。

従って、抗酸化活性が強く、水への溶解性に優れ、しかも抗酸化活性が長時間安定である天然物由来の抗酸化剤が強く求められている。

皮膚の着色やシミ等の色素沈着の要因としては、生体内における代謝障害等の内因的要素と、紫外線等による外因的要素とが挙げられる。一般に多くみられるのは後者の外因的要素によるものであり、紫外線によりメラノサイトが刺激を受け、メラノサイトが活性化することによりチロシナーゼ酵素が働き、皮膚への色素沈着が生じる。このメラノサイトの活性を抑制し、チロシナーゼ酵素及びメラニン色素の生成を抑制することにより、皮膚の着色やシミ等の色素沈着が防止できることが知られている。そこで、化粧品業界においては、美白作用を有する物質の開発が従来から重要視されており、様々な美白剤が開発されている。更に、近年、オゾン層の破壊等により紫外線の量が増加しつつあり、これに伴い、消費者の紫外線対策に対する要求が更に高まり、安全で有効な美白剤が強く求められている。

皮膚の水分保持、柔軟性、弾力性に作用する物質として、コラーゲンやヒアルロン酸などが知られている。コラーゲンは、皮膚では真皮の90%を占め、真皮全体に分布しており、皮膚に適度な弾性及び強度を保持させる。また、ヒアルロン酸は、皮膚、関節液、硝子体、韌帯など生体に広く分布しており、皮膚において、細胞の接着、細胞の保護、皮膚組織の形成、組織の水分保持、柔軟性の維持などを担っている。生体内でコラーゲンを分解する酵素としてコラゲナーゼ、ヒアルロン酸を分解する酵素としてヒアルロニダーゼが知られているが、これらによってコラーゲンやヒアルロン酸が分解されその量が減少すると、皮膚の潤い、ハリがなくなり、皮膚の老化現象であるシワやたるみが起こるといわれている。

そこで、皮膚外用剤や各種化粧料に、皮膚の老化防止やしわ防止作用等を期待してこれら酵素の活性を阻害する物質等を配合することが提案され、従来、様々なコラゲナーゼ活性阻害剤やヒアルロニダーゼ活性阻害剤が開発されている。

ところで、カムカムの実は、アセロラの果実と同様に豊富なビタミンCを含有している植物として認識されている。そして、カムカムの果実は、南米において化粧品や食料品として市販されており、近年では日本でも食料品用素材として輸入・販売されている。また、このようなカムカムの果実に多く含まれる成分がビタミンCであるため、その抽出物においては抗酸化剤、保湿剤、美白剤としての用途が見出されている(例えば、特開平9-221429号公報、特開平11-246336号公報、特開2000-327549号公報、

特開 2000-327550 号公報、特開 2001-31558 号公報)。

しかし、カムカムの果実において化粧品や食料品に利用されているのは、ビタミン C を多く含む果肉のみであり、その種子は、ビタミン C を極微量しか含まないためにその有効利用の途が見出されておらず、廃棄されているのが現状である。

#### 発明の開示

本発明の目的は、従来、廃棄処理されていたカムカム種子の有効利用が可能となり、安全性に優れ、皮膚外用剤や化粧料等に利用可能な美白作用を有する美白剤、該美白剤を配合した皮膚外用剤及び化粧料を提供することにある。

本発明の他の目的は、安定した抗酸化作用、コラゲナーゼ活性阻害作用やヒアルロニダーゼ活性阻害作用を期待しうる安全性に優れ、皮膚の老化防止やしわ防止作用が期待しうる皮膚外用剤及び化粧料を提供することにある。

本発明者らは、上記課題を解決するために、まず、従来、果汁の圧搾後、廃棄されていたカムカム種子の有用性について鋭意検討した。その結果、カムカム種子から得られる抽出物が、皮膚外用剤、化粧料用途等に利用可能な、強力な抗酸化作用、美白作用、コラゲナーゼ活性阻害作用、ヒアルロニダーゼ活性阻害作用、更には老化防止作用を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

本発明によれば、カムカム種子の抽出物を有効成分として含む美白剤が提供される。

また本発明によれば、前記美白剤を含む皮膚外用剤又は化粧料が提供される。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、参考例 1 で行った DPPH ラジカル消去能測定試験の結果を示すグラフである。

図 2 は、参考例 2～4 で行った DPPH ラジカル消去能測定試験の結果を示すグラフである。

図 3 は、参考例 5 で行ったリノール酸自動酸化抑制能測定試験の結果を示すグラフである。

図 4 は、参考例 5 で行ったリノール酸自動酸化抑制能測定試験における各サンプルの 7 日目の酸化率を示すグラフである。

図 5 は、実施例 1 で行ったメラニン色素生成抑制試験の結果を示すグラフである。

図 6 は、実施例 1 で行った各培地における総蛋白重量を測定した結果を示すグラフである。

図7は、参考例6で行ったコラゲナーゼ活性阻害作用試験の結果を示すグラフである。

図8は、参考例7で行ったヒアルロニダーゼ活性阻害作用試験の結果を示すグラフである。

#### 発明の好ましい実施の態様

以下本発明を更に詳細に説明する。

本発明の美白剤は、カムカム種子抽出物を有効成分とし、該抽出物は、抗酸化剤、コラゲナーゼ活性阻害剤、ヒアルロニダーゼ活性阻害剤又は老化防止剤の有効成分としても有効である。該抽出物の原料として用いるカムカム種子は、フトモモ科(*Myrtaceae*)ジャボチカバ属(*Myrciaria*)の果樹であるカムカム(CAMU CAMU、学名*Myrciaria dubia*)の種子である。

前記カムカムは、中南米熱帯雨林地域の河流付近の湿地帯に生育し、高さ2~3mで、直径2~3cmの赤い実を結ぶ灌木である。カムカムの実は、豊富なビタミンCが含まれるが、カムカム種子は、ビタミンCが実質的に含まれておらず、その用途が見出せないために、従来、廃棄処理されてきた。

実験の結果、カムカム果実の抽出物中には、通常、ビタミンCが1789mg/100g(還元型ビタミンC:1485mg/100g+酸化型ビタミンC:295mg/100g)含まれるのに対し、カムカム種子の抽出物中には、通常、ビタミンCが1mg/100g(還元型ビタミンC:0mg/100g+酸化型ビタミンC:1mg/100g)が含まれるにすぎない。

本発明の美白剤、更には抗酸化剤、コラゲナーゼ活性阻害剤、ヒアルロニダーゼ活性阻害剤及び老化防止剤において有効成分として含むカムカム種子の抽出物は、カムカム種子を、抽出溶媒を用いて抽出したものであれば特に限定されず、抽出液であっても、抽出液を濃縮、乾燥等により得られる抽出固形物であっても良い。抽出は1回の抽出操作でも良いが、所望に応じて他の溶媒を用いて抽出操作を複数回行うことでもできる。

前記カムカム種子の抽出物は、没食子酸及びその塩を含むように抽出することが好ましい。

前記抽出溶媒は、例えば、水、有機溶媒が挙げられ、該有機溶媒は、親水性有機溶媒、疎水性有機溶媒のいずれでもよい。親水性有機溶媒としては、例えば、メチルアルコール、エチルアルコール、グリセリン、プロピレンジコール、1,3-ブチレン

リコール等のアルコール；アセトン、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、1,4-ジオキサン、ピリジン、ジメチルスルホキシド、N,N-ジメチルホルムアミド、酢酸等の公知の有機溶媒が挙げられる。疎水性有機溶媒としては、例えば、ヘキサン、シクロヘキサン、四塩化炭素、クロロホルム、ジクロロメタン、1,2-ジクロロエタン、ジエチルエーテル、酢酸エチル、ベンゼン、トルエン等の公知の有機溶媒が挙げられる。これらの有機溶媒は使用に際しては1種又は2種以上を組み合わせて用いることができる。中でも、水及び／又は親水性有機溶媒、特に、メタノール、エタノール、1,3-ブチレングリコール、水又はこれらの混合物や組合せが好ましい。

抽出条件は特に限定されないが、例えば、温度は5～95°C、好ましくは10～90°C、更に好ましくは15～85°Cで、常温でも好適に抽出できる。温度が高い方が、抽出効率が高くなる傾向がある。抽出時間は、数時間～数日間であり、また、抽出に使用する溶媒量は、原料に対して重量比で通常1～50倍量、好ましくは5～25倍量である。

抽出操作も特に限定的ではなく、常法に従って行えばよい。抽出効率を向上させるため、振とう抽出や、攪拌機等を備えた抽出機を用いても抽出することができる。例えば、カムカム種子を抽出溶媒に浸漬するか、若しくは浸漬せずに、抽出溶媒と共に攪拌、振とうする抽出処理を行い、処理液を、濾過、遠心分離又はデカンテーション等によって抽出液と抽出残渣に分離することにより抽出処理を行うことができ、抽出残渣は更に同様な抽出処理に付しても良い。得られる抽出液はそのまま用いても良いが、必要により、更に濃縮処理及び／又は分画・精製処理することもできる。

前記濃縮処理は特に限定されず、例えば、溶媒除去、水及び／又は有機溶媒に対する溶解性を利用した可溶分回収処理、不溶分回収処理、水一疎水性有機溶媒での液液分配処理、再結晶処理、再沈澱処理、冷却により生じた析出物を回収する処理等、若しくはこれらから選択される2種以上の処理を組合せる方法等が挙げられる。

前記分画・精製処理も特に限定されず、例えば、順相及び／又は逆相クロマトグラフィーによる処理等が挙げられる。

本発明の美白剤、更には抗酸化剤の有効成分としてのカムカム種子の抽出物は、没食子酸及び／又はその塩を含むことが好ましい。また、カムカム種子の抽出物をコラゲナーゼ活性阻害剤、ヒアルロニダーゼ活性阻害剤又は老化防止剤の有効成分として使用する場合にも該抽出物に、没食子酸及び／又はその塩が含まれていても良い。

本発明の美白剤、更には、抗酸化剤、コラゲナーゼ活性阻害剤、ヒアルロニダーゼ

活性阻害剤又は老化防止剤において、有効成分であるカムカム種子の抽出物の使用量は、使用形態等により適宜選択することができる。

本発明の皮膚外用剤及び化粧料は、前記本発明の美白剤を含む。また、前記美白剤、抗酸化剤、コラゲナーゼ活性阻害剤、ヒアルロニダーゼ活性阻害剤、老化防止剤の少なくとも1種を含む皮膚外用剤及び化粧料も提供される。

前記化粧料の種類は特に限定されず、例えば、化粧水、乳液、クリーム、パック、洗浄料等のスキンケア化粧料；口紅、ファンデーション等のメーキャップ化粧料；頭髪用化粧料等が挙げられ、その剤型は特に制限されず任意である。また、皮膚外用剤としては、軟膏、各種皮膚用薬剤等が挙げられる。

本発明の皮膚外用剤及び化粧料において、本発明の美白剤、更には抗酸化剤、コラゲナーゼ活性阻害剤、ヒアルロニダーゼ活性阻害剤又は老化防止剤の配合割合は、その種類及び配合される他の成分の種類や量、形態等に応じて適宜選択できるが、通常、皮膚外用剤又は化粧料全量に対して、カムカム種子抽出物の乾燥物換算で0.001～20重量%、好ましくは0.01～10重量%である。

本発明の皮膚外用剤及び化粧料には、本発明の所望の効果を損なわない範囲で、通常、化粧料原料として用いられる種々の他の成分を配合することができる。他の成分としては、例えば、水、油剤、界面活性剤、潤滑剤、アルコール類、水溶性高分子剤、ゲル化剤、保湿剤、緩衝剤、防腐剤、抗炎症剤、増粘剤、香料、ビタミン類、本発明の美白剤、抗酸化剤、コラゲナーゼ活性阻害剤、ヒアルロニダーゼ活性阻害剤又は老化防止剤以外の美白剤、抗酸化剤、コラゲナーゼ活性阻害剤、ヒアルロニダーゼ活性阻害剤又は老化防止剤等を挙げることができ、使用に際しては、皮膚外用剤、化粧料の種類や他の目的、更にはその形態等に応じて適宜選択して配合することができる。

前記カムカム種子抽出物を有効成分とする抗酸化剤を配合して抗酸化作用を有する食料品を提供することもできる。該食料品は、前記抗酸化剤を含んでおれば良い。食料品の種類は特に限定されず、例えば、飴、飲料、ジャム、チューインガム等が挙げられる。また、その剤型は特に制限されず任意である。

前記食料品において、前記抗酸化剤の配合割合は、食料品の種類及び該食料品に配合される他の成分の種類や量に応じて適宜選択することができるが、通常、食料品全量に対して、カムカム種子抽出物の乾燥固形分として0.001～10重量%、好ましくは0.01～8重量%である。

前記食料品には、所望の効果を損なわない範囲で、通常、食料品原料として用いられる種々の他の成分を配合することができる。他の成分としては、例えば、水、アルコール類、甘味料、酸味料、着色料、保存料、香料、賦形剤等が挙げられ、使用に際しては、食料品の種類や他の目的、更にはその形態等に応じて適宜選択して配合することができる。

本発明の美白剤、更には抗酸化剤、コラゲナーゼ活性阻害剤、ヒアルロニダーゼ活性阻害剤及び老化防止剤は、カムカム種子の抽出物を有効成分とするので、強力な抗酸化活性、メラニン色素生成抑制作用、コラゲナーゼ活性阻害作用、ヒアルロニダーゼ活性阻害作用及び老化防止作用を示すと共に安全性にも優れる。従って、美白効果や抗老化作用を期待して皮膚外用剤や化粧品に、また活性酸素に起因する食料品の品質保持や酸化防止作用を期待して食料品への利用が可能である。加えて、従来、産業廃棄物であったカムカム種子の有効利用をも可能となる。

#### 実施例

以下、本発明を参考例、実施例及び処方例により更に詳細に説明するが本発明はこれらに限定されない。

##### 参考例 1

粉碎したカムカム種子にメタノールを入れて、25°C、一晩攪拌抽出を行った。5°C、4000rpm、45分間の遠心分離を行い、粗濾過後、0.22 μm フィルター濾過した。得られたカムカム種子メタノール抽出液を減圧蒸留して蒸発乾固させ、乾固物を精製水で溶解した。これに n-ヘキサンを加え 5 分間振盪と静置を繰り返し、n-ヘキサンと水溶性画分に分け、n-ヘキサン画分が着色しなくなるまで行った。得られた水溶性画分に酢酸エチルを加えて、n-ヘキサンの時と同様の方法にて分画を行い、酢酸エチル画分と水溶性画分に分けた。酢酸エチル画分を減圧蒸留により濃縮し、これをシリカゲルカラムにより分画を行った。溶出は、濃度比率を 11 段階(10 : 0 ~ 0 : 10)に調整したクロロホルム/メタノール混合液によって行った。濃度比率が 5 : 5 ~ 0 : 10 のクロロホルム/メタノール混合液で溶出された画分をまとめ、減圧蒸留により蒸発乾固させ、乾固物を精製水で溶解した。

次にこの水溶物を、C18 カラムにより精製した。精製は、上記方法によって得られた水溶物を C18 カラムに添加し、更に精製水でカラム洗浄して得た未吸着の画分を、蒸発乾固させる方法で行った。未吸着の画分は、始めに着色した画分が得られ、次い

で透明な画分の 2 タイプの画分が得られた。それぞれ減圧蒸留により蒸発乾固させて、水に易溶性であるサンプル(A)及び水に難溶性であるサンプル(B)を得た。

LCMS 分析は、LCT 質量分析計(micromass 社製)を使用し、イオン化法(ESI)で測定を行った。NMR 分析は、UNITY plus 500 型(Varian 社製)を使用し、観測周波数を  $^1\text{H}$  : 500.2MHz,  $^{13}\text{C}$  : 125.8MHz とし、溶媒はサンプル(A)では  $\text{D}_2\text{O}$  を、サンプル(B)では  $\text{CD}_3\text{OD}$  を用いた。

サンプル(A)の LCMS 分析の結果、脱プロトン化分子( $(\text{M}-\text{H})^-$ )と考えられるイオンが  $m/z$  169 に観測され、分子量は 170 と推測された。また、NMR 分析の結果、 $^1\text{H}$ -NMR スペクトルでは、7.062ppm にシングルピークと 3.5~3.9ppm に数種類のピークが観測され、 $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルでは、110~146ppm に 4 種類の二重結合炭素、175.8ppm にカルボニル炭素が観測された。これらを没食子酸(Gallic Acid)標品のスペクトルと比較した結果、分子量は一致したが、COOH と COOH が結合する炭素の化学シフトが異なることから、この物質は没食子酸塩であると同定された。

一方、サンプル(B)の LCMS 分析の結果、脱プロトン化分子( $(\text{M}-\text{H})^-$ )と考えられるイオンが  $m/z$  169 に観測され、分子量は 170 と推測された。また、NMR 分析の結果、 $^1\text{H}$ -NMR スペクトルでは、7.060ppm にシングルピークが観測され、 $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルでは、5 種類のピークが観測された。これらを没食子酸標品のスペクトルと比較した結果、化学シフトが一致し、分子量も一致したことから、この物質は没食子酸であると同定された。

得られた抽出物(B)について抗酸化活性を以下の方法に従って測定した。

#### <DPPH ラジカル消去能測定試験>

試験管に抽出物(B)400  $\mu\text{l}$ 、99.5%エタノール 1200  $\mu\text{l}$ 、0.25M 酢酸緩衝液(pH 5.5)1600  $\mu\text{l}$ を入れ、30°C、5 分間プレインキュベートした。試験管に 500  $\mu\text{M}$  DPPH 溶液を 800  $\mu\text{l}$  加えて攪拌し、30°C、30 分間反応させ、正確に 30 分後、蒸留水を対照として 517nm で吸光度を測定した。測定値から DPPH ラジカル消去率を算出し、50%ラジカル消去能( $\text{IC}_{50}$ )を求めた。また、既知の抗酸化成分である  $\alpha$ -トコフェロールについても同様に DPPH ラジカル消去能について測定を行った。結果を図 1 に示す。

図 1 より、カムカム種子抽出物の 50%DPPH ラジカル消去能(以下  $\text{IC}_{50}$ )は、蒸発残留物値換算より  $\text{IC}_{50}=0.06\text{mg/g}$  であり、既知の抗酸化成分である  $\alpha$ -トコフェロールの  $\text{IC}_{50}=0.13\text{mg/g}$  と比較して、高い DPPH ラジカル消去能を有することが判明

した。

#### 参考例 2

カムカム種子 1kg を破碎し、水 4kg を加えて、室温にて一晩以上攪拌抽出した。攪拌抽出後、遠心分離を行って上清と粗残渣とに分離し、残渣を取り除き上清のみを採取した。更に清澄化する為に多段階のフィルター濾過を行い、細かい残渣を取り除いた。以上の手順により、清澄な水溶性のカムカム種子抽出物を約 4kg (固形分 1%) 得た。この抽出物を抽出物(C)とする。

得られた抽出物(C)について、参考例 1 と同様に DPPH ラジカル消去能測定試験を行った。また、既知の抗酸化成分である  $\alpha$ -トコフェロールについても同様に DPPH ラジカル消去能について測定を行った。結果を図 2 に示す。図 2 より、抽出物(C)の  $IC_{50}$  は 0.10mg/g であった。 $\alpha$ -トコフェロールの  $IC_{50}$  は 0.13mg/g であった。

#### 参考例 3

カムカム種子 1kg を破碎し、水 1.17kg と 1,3-ブチレングリコール 0.5kg との混合溶媒を加えて、室温にて一晩以上攪拌抽出した。攪拌抽出後、遠心分離を行って上清と粗残渣に分離し、残渣を取り除き上清のみを採取した。更に清澄化する為に多段階のフィルター濾過を行い、細かい残渣を取り除いた。以上の手順により、30% の 1,3-ブチレングリコール抽出による清澄なカムカム種子抽出物を約 1.3kg (固形分 3%) 得た。この抽出物を抽出物(D)とする。

得られた抽出物(D)について、参考例 1 と同様に DPPH ラジカル消去能測定試験を行った。結果を図 2 に示す。図 2 より、抽出物(D)の  $IC_{50}$  は 0.07mg/g であった。

#### 参考例 4

カムカム種子 200g を破碎し、エタノール 2kg を加えて、室温にて一晩以上攪拌抽出した。攪拌抽出後、フィルターによる粗濾過を行って残渣を取り除き上清のみを採取した。次に、減圧蒸留を行いエタノールを除去した。乾固させたものに水 500g を加えて溶解し、清澄化する為に多段階のフィルター濾過を行った。以上の手順により、エタノール抽出による水溶性の清澄なカムカム種子抽出物を約 500g (固形分 2.5%) 得た。この抽出物を抽出物(E)とする。

得られた抽出物(E)について、参考例 1 と同様に DPPH ラジカル消去能測定試験を行った。結果を図 2 に示す。図 2 より、抽出物(E)の  $IC_{50}$  は 0.10mg/g であった。

#### 参考例 5

参考例3で調製した抽出物(D)を用い、以下に示すリノール酸自動酸化抑制能測定試験を行った。

＜リノール酸自動酸化抑制能測定試験＞

2.5%(w/v)リノール酸を含むエタノール2mlと、0.05Mリン酸緩衝液(pH7.0)4mlとを混合し反応液を調製した。次に、抽出物(D)が任意量含まれるように、99.5%エタノール2ml及び蒸留水2mlを用いて希釈調整した。調整した希釈物を前記反応液に添加して計10mlとし、混和後、褐色ネジロ瓶に入れてサンプルとした。

また、陰性コントロールとしては何も添加せず、99.5%エタノール2ml及び蒸留水2mlのみを反応液に添加したサンプルを用いた。陽性コントロールとしては、 $\alpha$ -トコフェロール及びBHAを抽出物(D)と同様の操作方法で同濃度に調製したサンプルを用いた。更に、抽出物(D)の抗酸化作用が、上述したカムカム種子の抽出物に含まれる没食子酸によるもののみでないことを確認するために、没食子酸を抽出物(D)と同様の操作方法で以下に示す濃度に調製したサンプルを用いた。

没食子酸の濃度は、抽出物(D)に含まれていると思われる最大量を用いて行った。即ち、抽出物(D)中のポリフェノール量をフォリン-デニス法により測定した。抽出物(D)に対して、ポリフェノールの占める割合は約20%という結果が得られた。没食子酸はポリフェノールの一種である為、例えば、抽出物(D)中のポリフェノールの全量が没食子酸であったとしても、抽出物(D)に占める最大値は約20%ということになり、これ以上高い濃度で没食子酸が含まれる可能性は限りなく低いと考えられる。従って、抽出物(D)中に含まれる没食子酸の濃度を20%と推定した。

調製した各サンプルを40°C、暗所で保存したものを本検、4°C、暗所で保存したものを盲検として、経時的に7日間測定した。

測定方法としては、サンプル0.1ml、75%エタノール9.7ml、30%ロダンアンモニウム溶液0.1mlを混合し、 $2 \times 10^{-2}$ M塩化第一鉄(3.5%塩酸溶液)0.1mlを加え、正確に3分後に500nmで吸光度を測定した。測定値から吸光度差及び7日目の自動酸化率を求めた。盲検についても同様に測定し、 $\Delta$ 吸光度=(本検の吸光度)-(盲検の吸光度)とした。結果を図3に示す。

サンプルの酸化が始まると吸光度は上昇し、最高点に達した後、酸化されるべきサンプルが少なくなるにつれて吸光度は減少する。従って、吸光度のピークが早くできはじめるほど抗酸化活性は弱いと判断できる。

測定した酸化率を用いて各サンプルの抗酸化活性を比較した。酸化率は、試験開始から 7 日間経過した時のコントロールの酸化(△吸光度)を 100% として以下の式で算出した。結果を図 4 に示す。

$$\text{リノール酸自動酸化率}(\%) = ([\text{サンプルの } \Delta \text{吸光度}] \div [\text{コントロールの } \Delta \text{吸光度}]) \times 100$$

図 4 において酸化率は、数値が高いほど抗酸化活性が低いと判断できることから、抽出物(D)は、非常に高い抗酸化活性を有していると結論づけられる。

#### 実施例 1

参考例 3 で調製した抽出物(D)を用いて、マウス由来 B16 メラノーマ細胞を使用し、細胞レベルでの美白効果の確認試験を行った。この試験法は、動物細胞を使用することにより、生体内により近い環境下でメラニン色素の生成抑制作用及び細胞増殖に与える影響を確認することができる。

シャーレにマウス由来 B16 メラノーマ細胞を  $1 \times 10^5 \text{ cells/dish}$  播き込み、37°C、5% CO<sub>2</sub>条件下で 2 日間培養した。培養液を除去後、各試験培地(プランク培地(10%FBS / DME)、既知の美白成分を比較対照としたコウジ酸調整培地、カムカム種子抽出物である抽出物(D)調整培地)を各々 10ml / dish ずつ加え、更に 37°C、5% CO<sub>2</sub>条件下で 3 日間培養した。培養液を除去後、トリプシン溶液で細胞を剥がして遠心分離を行い、PBS に懸濁後、再度遠心分離を行った。上清を除いた細胞ペレットに水酸化ナトリウム溶液を加え、加熱処理を行い、メラニン色素を溶解し、更に細胞由来の線維状物質をフィルター除去した。吸光度計にて溶解したメラニン色素の測定と BIO-RAD 社 DC-Protein Assay KIT を用いた蛋白量の測定を行った。

プランク培地をコントロールとして用い、そのメラニン色素生成抑制率を 0% とした時の、各サンプルのメラニン色素生成抑制率を以下の式で算出した。結果を図 5 に示す。

$$\text{メラニン色素生成抑制率}(\%) = 100 - ([\text{サンプルの総蛋白 } 1\text{mg} \text{当たりのメラニン量の平均値}] \div [\text{コントロールの総蛋白 } 1\text{mg} \text{当たりのメラニン量の平均値}]) \times 100$$

図 5 においてメラニン色素生成抑制率は、数値が高いほど美白活性が高いといえることから、カムカム種子抽出物である抽出物(D)は、非常に高い美白活性を有していることが判った。

また、総蛋白量は細胞数と比例する為、各試験培地の総蛋白重量を測定し、細胞増

殖に与える影響についての確認を行った。結果を図 6 に示す。

図 6 より、各サンプルの細胞増殖に与える影響について、問題は認められなかつた。更に、顕微鏡観察下においても問題が認められなかつた。

### 実施例 2

平成 9 年 3 月 26 日付厚生省令第 21 号「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」に従つて参考例 3 で調製したカムカム種子抽出物(D)の安全性試験を行なつた。結果を表 1 に示す。

#### ラットを用いる単回経口投与毒性試験

ラット 2 群(対照群、投与群)に対して、雌雄各 5 匹／群にて試験を行い、投与群には体重あたり 2g/kg 投与した。

#### モルモットを用いる皮膚一次刺激性試験

モルモット 3 匹の健常皮膚に 24 時間閉塞貼付を行い、投与後 24 時間、48 時間及び 72 時間に、それぞれ皮膚の状態を観察して判定を行つた。

#### モルモットを用いる 14 日間皮膚累積刺激性試験

モルモット 3 匹の健常皮膚に、14 日間連続の開放系で 1 日 1 回塗布を行い、試験期間中の毎日、塗布前及び塗布後 24 時間に、それぞれ皮膚の状態を観察して判定を行つた。

#### モルモットを用いる皮膚感作性試験

モルモット 3 群(対照群、塗布群、DNCB 群)に対して、5 匹／群にて Adjuvant and Patch Test 法に準じて試験を行い、塗布後 24 時間及び 48 時間に、それぞれ皮膚の状態を観察して判定を行つた。

#### モルモットを用いる皮膚光毒性試験

モルモット 10 匹の背部皮膚に森川藤鳳らの方法に準じて試験を行い、紫外線照射後 24 時間、48 時間及び 72 時間にそれぞれ皮膚の状態を観察して判定を行つた。

#### モルモットを用いる皮膚光感作性試験

モルモット 3 群(対照群、投与群、TCSA 群)に対して、5 匹／群にて Adjuvant and Strip 法に準じて試験を行い、紫外線照射後 24 時間及び 48 時間に、それぞれ皮膚の状態を観察して判定を行つた。

#### ウサギを用いる眼粘膜刺激性試験

ウサギ 2 群(非洗眼群、洗眼群)に対して、3 匹／群にて試験を行つた。点眼後、非

洗眼群はそのままにし、洗眼群は微温の生理食塩水で約1分間洗浄し、その後1時間、24時間、48時間及び72時間後に、角膜、虹彩及び結膜の状態について観察し、AFNORの区分から判定を行った。

#### 細菌を用いる復帰突然変異試験

プレインキュベーション法により、S9mix無添加とS9mix添加の場合について測定を行った。

- ・使用菌株：Salmonella typhimurium TA100、TA98、TA1535、TA1537
- ・使用菌株：Escherichia coli WP2uvrA

#### 哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験

哺乳類の培養細胞(CHL/IU細胞)を用いて3群(陰性対照群、被検物質群、陽性対照群)に対して、短時間処理法(6時間処理：S9mix無添加及びS9mix添加)及び連続処理法(24時間及び48時間処理)で検討を行った。

表 1

安全性試験項目	結果
1)ラットを用いる単回経口投与毒性試験	毒性なし
2)モルモットを用いる皮膚一次刺激性試験	刺激性なし
3)モルモットを用いる14日間皮膚累積刺激性試験	刺激性なし
4)モルモットを用いる皮膚感作性試験	感作性なし
5)モルモットを用いる皮膚光毒性試験	光毒性なし
6)モルモットを用いる皮膚光感作性試験	光感作性なし
7)ウサギを用いる眼粘膜刺激性試験	眼刺激性なし
8)細菌を用いる復帰突然変異試験	変異原性なし
9)哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験	異常なし

#### 参考例6

参考例2で調製した抽出物(C)、参考例3で調製した抽出物(D)及び参考例4で調製した抽出物(E)について、比較対照に没食子酸一水和物を用いて以下の方法によりコラゲナーゼ活性阻害作用を測定した。

#### <コラゲナーゼ活性阻害作用試験>

##### [試薬の調製]

基質溶液：Pz-ペプチド(BACHEM社製)0.39mgを、0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH7.1、含20mM塩化カルシウム)1mlに溶解して使用した(0.5mMに相当)。

酵素溶液：コラゲナーゼ (TYPE IV、シグマ社製)5mg を蒸留水 1ml に溶解させ 100  $\mu$ l ずつ分注し、-20°Cで保管した。使用時に蒸留水で 50 倍に希釈して反応に用いた。

抽出物(C)、抽出物(D)及び抽出物(E)は溶液であることから、カムカム種子抽出物が乾燥固体として 100  $\mu$ g/ml の濃度となるように各々の抽出溶媒 (蒸留水、30 重量%1,3-ブチレングリコール)で希釈を行いサンプルとした。このサンプル 50  $\mu$ l に酵素溶液 50  $\mu$ l 及び基質溶液 400  $\mu$ l を混合し、37°Cで 30 分間反応させた。次いで、25mM クエン酸溶液 1ml で反応を停止し、酢酸エチル 5ml で抽出した。遠心分離(3000rpm、10 分間)後、酢酸エチル層を分取した。酢酸エチルを対照として 320nm における吸光度を測定した。

コントロールにはサンプルの代わりに各々の抽出溶媒を用い、プランクには酵素溶液の代わりに蒸留水を用いて同様の操作を行った。

この時に、カムカム種子抽出物のコラゲナーゼ活性阻害が、カムカム種子抽出物に含まれる没食子酸によるもののみでないことを確認する為に、没食子酸一水和物を各抽出物と同様の 100  $\mu$ g/ml の濃度となるように、蒸留水で濃度調整を行いサンプルとした。

これらの値からコラゲナーゼ活性阻害率を以下の式で算出した。結果を図 7 に示す。  
コラゲナーゼ活性阻害率(%)=(1-[サンプルの吸光度-サンプルプランクの吸光度] ÷ [コントロールの吸光度-コントロールプランクの吸光度])×100

#### 参考例 7

参考例 3 で調製した抽出物(D)について、比較対照に没食子酸一水和物を用いて以下の方法によりヒアルロニダーゼ活性阻害作用を測定した。ヒアルロニダーゼ活性阻害測定は Morgan-Elson 法を応用した前田有美恵らの方法(食衛誌、31巻、233-237、1990 年)に準じて行った。

#### <ヒアルロニダーゼ活性阻害作用試験>

##### [試薬の調製]

酵素溶液：牛精巣ヒアルロニダーゼ(和光純薬工業(株)製)を 0.1M 酢酸緩衝液 (pH=4.0)に溶解し最終酵素活性を 400 ユニット/ml に調整した。

酵素活性化溶液：compound 48/80 (シグマ社製) を 0.1M 酢酸緩衝液(pH=4.0)に溶解し最終濃度を 0.1mg/ml に調整した。

基質溶液：ヒアルロン酸カリウム(和光純薬工業(株)製)を 0.1M 酢酸緩衝液(pH=4.0)

に溶解し最終濃度を 0.4mg/ml に調整した。

ホウ酸溶液：ホウ酸 4.95g に水 50ml を加え、1N 水酸化ナトリウム溶液で pH=9.1 にし、蒸留水を加えて 100ml に調整した。

p-ジメチルアミノベンズアルデヒド(p-DAB)試薬：10N 塩酸 12.5ml と酢酸 87.5ml の混液に p-DAB(和光純薬工業(株)製)を 10g 溶解し冷蔵保存する。使用直前に酢酸で 10 倍希釈して用いた。

参考例 3 の抽出物(D)は溶液であることから、カムカム種子抽出物が乾燥固形物として 1mg/ml の濃度となるように抽出溶媒である 30 重量%1,3-ブチレングリコール水溶液で希釈したものを上限とし、更に抽出溶媒で希釈して濃度調整を行いサンプルとした。このサンプル 0.2ml に酵素溶液 0.1ml を加えて、37°Cで 20 分間加温した。次に酵素活性化溶液 0.2ml を加えて 37°Cで 20 分間加温し、さらに基質溶液 0.5ml を加えて 37°Cで 40 分間反応させた後、0.4N の水酸化ナトリウム水溶液を 0.2ml 加えるとともに氷冷して反応を停止させた。ホウ酸溶液 0.2ml を加えてホットブロックバス (TOYO SEISAKUSHO、MODEL TPB-32)で 5 分間加熱後氷冷し、p-DAB 試薬 6ml を加えて 37°Cで 20 分間加温して発色させ、蒸留水を対照として 585nm における吸光度を測定した。

コントロールにはサンプルの代わりに抽出溶媒を用い、ブランクには酵素溶液の代わりに 0.1M 酢酸緩衝液(pH=4.0)を加えて同様の操作を行った。

この時に、抽出物(D)のヒアルロニダーゼ活性阻害が、カムカム種子抽出物に含まれる没食子酸によるもののみでないことを確認する為に、没食子酸一水和物を抽出物(D)と同様の操作方法で濃度調整を行った。この時の没食子酸一水和物の濃度は、実施例 5 と同様にカムカム種子抽出物の乾燥固形分量の 20% と推定した。

これらの値からヒアルロニダーゼ活性阻害率を以下の式で算出した。結果を図 8 に示す。

ヒアルロニダーゼ活性阻害率(%)=(1-[サンプルの吸光度-サンプルブランクの吸光度]÷[コントロールの吸光度-コントロールブランクの吸光度])×100

図 8 より、抽出物(D)は濃度依存的にヒアルロニダーゼ活性阻害能を有することが判明した。

#### 処方例 1

グリチルリチン酸ジカリウム 0.20 重量部、クエン酸 0.10 重量部、クエン酸ナトリ

ウム 0.30 重量部、参考例 3 で調製した抽出物(D)5.00 重量部及び 1,3-ブチレングリコール 5.00 重量部を混合して、精製水を加えて全体量を 80.0 重量部にして 50°Cで攪拌しながら溶解して抽出物(D)含有水溶液を調製した。

次いで、テトラオレイン酸 POE(60)ソルビトール 0.90 重量部、モノオレイン酸ソルビタン 0.10 重量部、適量の防腐剤及びエタノール 10.00 重量部を混合して、50°Cで攪拌しながら溶解した。続いて、得られた溶液を、最初に調製した抽出物(D)含有水溶液に少量ずつ加えて、50°Cで混和攪拌した。均一に混和したら、更に攪拌しながら 50°Cから 30°Cに液温を下げ、30°Cになったところで攪拌を止め、適量の香料及び精製水を加えて全体量を 100.00 重量部にした。再度、混和攪拌し、均一に混和させて化粧水を調製した。

#### 処方例 2

スクワレン 10.00 重量部及び適量の防腐剤を混合し、精製水を加えて全体量を 70.00 重量部に調整し、80°Cに加温して溶液(1)を調製した。また、カルボキシビニルポリマー-0.10 重量部及びキサンタンガム 0.20 重量部を適量の精製水に常温で攪拌溶解し溶液(2)を調製した。更に、トリエタノールアミン 0.10 重量部及び 1,3-ブチレングリコール 5.00 重量部を適量の精製水に常温で攪拌溶解し溶液(3)を調製した。更にまた、ヒアルロン酸ナトリウム 2.00 重量部及び参考例 3 で調製した抽出物(D)5.00 重量部を適量の精製水に常温で攪拌溶解し溶液(4)を調製した。

次いで、適量の精製水に溶液(1)を少量ずつ加え、80°Cで混和攪拌し、更に攪拌しながら溶液(2)を加え、続いて溶液(3)を加えた。均一に混和したら、攪拌しながら溶液を 50°Cに下げて、50°Cになったところで、溶液(4)を加え、更に精製水を加えて全体量を 100 重量部に調整した。溶液が 30°Cになるまで再度攪拌し、30°Cになったところで攪拌を止め、均一に混和された乳液を調製した。

#### 処方例 3

POE(20)ソルビタンモノステアレート 2.00 重量部、POE ソルビタンテトラオレート 0.50 重量部、モノステアリン酸グリセリル 0.50 重量部、ステアリン酸 7.00 重量部、セチルアルコール 3.00 重量部、パルミチン酸セチル 3.00 重量部、ホホバ油 7.00 重量部、パラフィン 3.00 重量部及び適量の防腐剤を混合して、80°Cで攪拌しながら溶解し溶液(1)を調製した。一方、参考例 3 で調製した抽出物(D) 5.00 重量部、1,3-ブチレングリコール 7.00 重量部及び精製水 62 重量部を混合して、80°Cで攪拌しながら

溶解し溶液(2)を調製した。

次いで、溶液(2)に溶液(1)を少量ずつ加え、乳化し、攪拌しながら冷却して 40°C に降温したところで攪拌を止め、均一に混和されたクリームを調製した。

#### 処方例 4

グラニュー糖 54.00 重量部を適量の精製水に溶解し、続いて、該溶解物を水飴 41.70 重量部に混合して加熱して煮詰めた。次いで、均一に混合攪拌しながら、クエン酸 1.00 重量部及び香料 0.30 重量部を少しずつ加え、攪拌しながら 90°C まで冷却後、参考例 2 で調製した抽出物(C)3.00 重量部を加えて攪拌した。得られた均一混和物を常法により成型し、キャンディーを調製した。

#### 処方例 5

イチゴ果実 65.00 重量部に砂糖 32.00 重量部を少しずつ加え、攪拌しながら加熱して煮詰めた。糖濃度が 65% 以上になったところで加熱を止め、参考例 2 で調製した抽出物(C)2.50 重量部、クエン酸 0.15 重量部及び適量の香料を加えて、均一に混和した。得られた濃縮液が熱いうちに瓶に詰め殺菌し、急速冷却することによってジャムを調製した。

#### 実施例 3

クエン酸ナトリウム 0.1 重量部、ピロリドンカルボン酸ナトリウム 1.0 重量部及び 1,3-ブチレングリコール 3.5 重量部を混合して精製水を加え、全体量を 50.0 重量部にして 50°C で攪拌しながら溶解し、溶液(1)を調製した。次に、POE(30)POP(6)デシルテトラデシルエーテル 0.6 重量部、エタノール 10.0 重量部、メチルパラベン 0.1 重量部を混合して 50°C で攪拌しながら溶解し、溶液(2)を調製した。

溶液(1)を溶液(2)に少量ずつ加えながら 50°C で混和攪拌し、更に攪拌しながら 30°C まで温度を下げ、30°C になったところで、参考例 3 で調製したカムカム種子抽出物(D)5.0 重量部を加えて混和した。これに精製水を加えて全体量を 100 重量部に調製し、均一に混和攪拌して、5 重量% 配合化粧水とした。

同様の方法で、1,3-ブチレングリコールを 4.7 重量部、カムカム種子抽出物(D)を 1.0 重量部として調製したものを、1 重量% 配合化粧水とした。

同様の方法で、1,3-ブチレングリコールを 5.0 重量部、カムカム種子抽出物(D)を無添加のものを、ブランク化粧水とした。

得られた化粧水製剤について、DPPH ラジカル消去能測定試験を用いて、カムカム

種子抽出物配合化粧水の抗酸化活性について評価を行った。

**<DPPH ラジカル消去能測定試験>**

**(試験方法)**

上記で調製したカムカム種子抽出物(D)を 1 重量%及び 5 重量%配合した化粧水製剤の抗酸化活性について、ブランク化粧水をコントロールとして参考例1に準じて測定を行い、その測定値から DPPH ラジカル消去率を算出した。

**(試験結果)**

カムカム種子抽出物(D)を配合した化粧水製剤の DPPH ラジカル消去率は、5 重量% 配合化粧水で 87.2%、1 重量% 配合化粧水で 26.8% であった。これにより、カムカム種子抽出物の配合濃度が高い化粧水製剤ほど、優れた抗酸化活性を示すことが判明した。

### 請求の範囲

1. カムカム種子の抽出物を有効成分として含む美白剤。
2. カムカム種子の抽出物が、没食子酸及びその塩の少なくとも1種を含む請求の範囲1の美白剤。
3. 請求の範囲1の美白剤を含む皮膚外用剤。
4. 請求の範囲1の美白剤を含む化粧料。

1/8

図1

## &lt;DPPHラジカル消去能測定&gt;

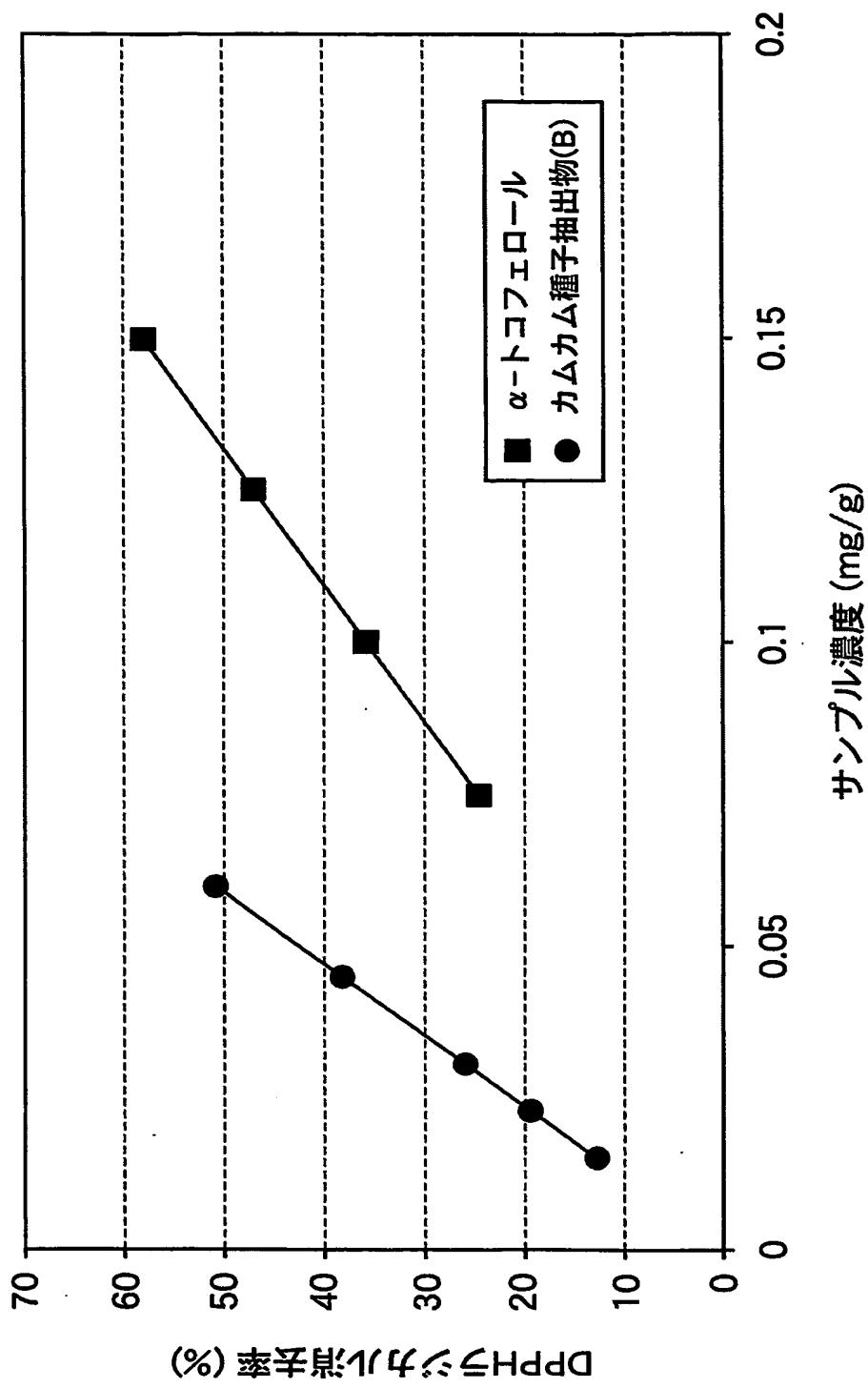
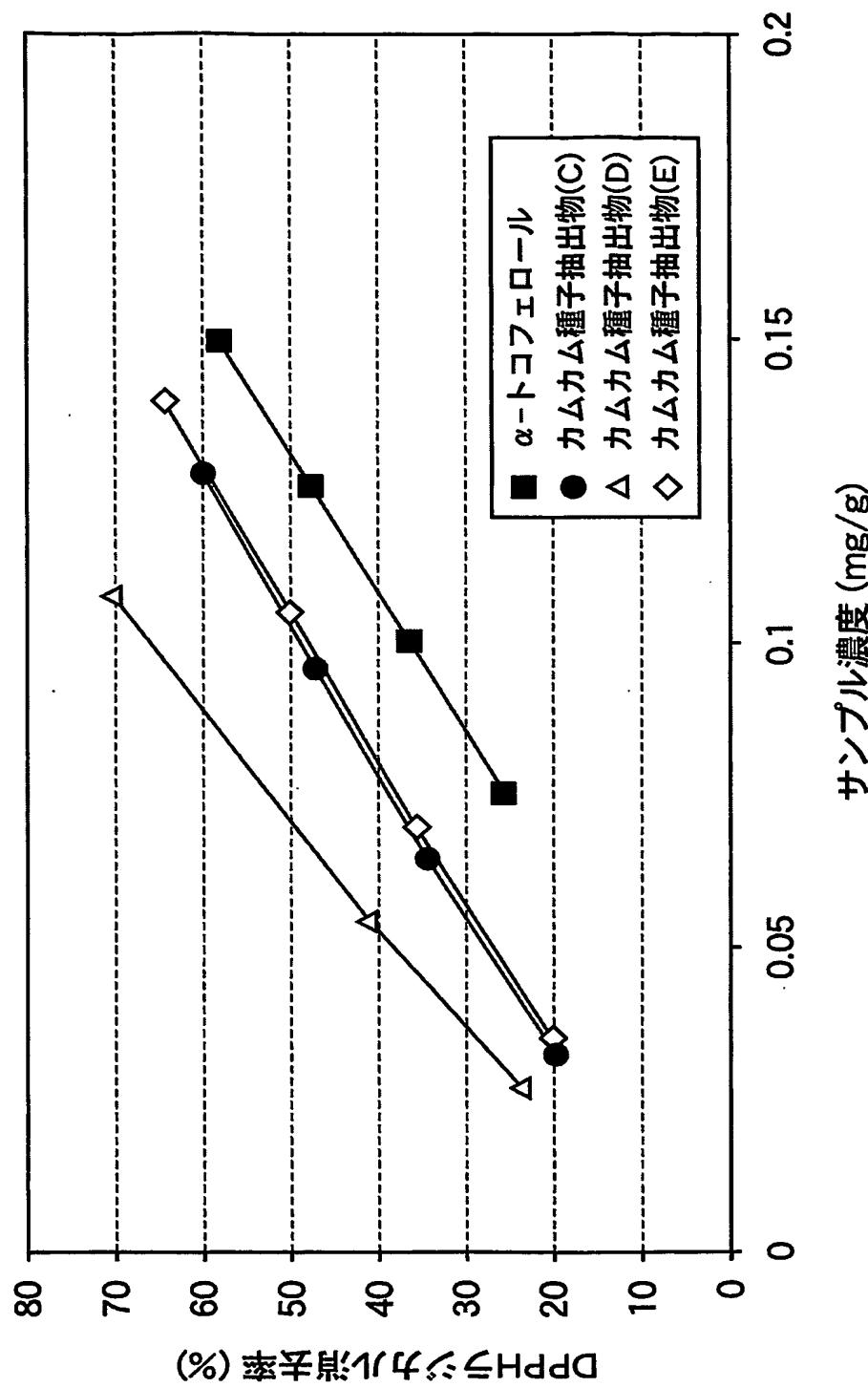


図2

## &lt;DPPHラジカル消去能測定&gt;



3

リノール酸自動酸化抑制能測定：0.02%区分

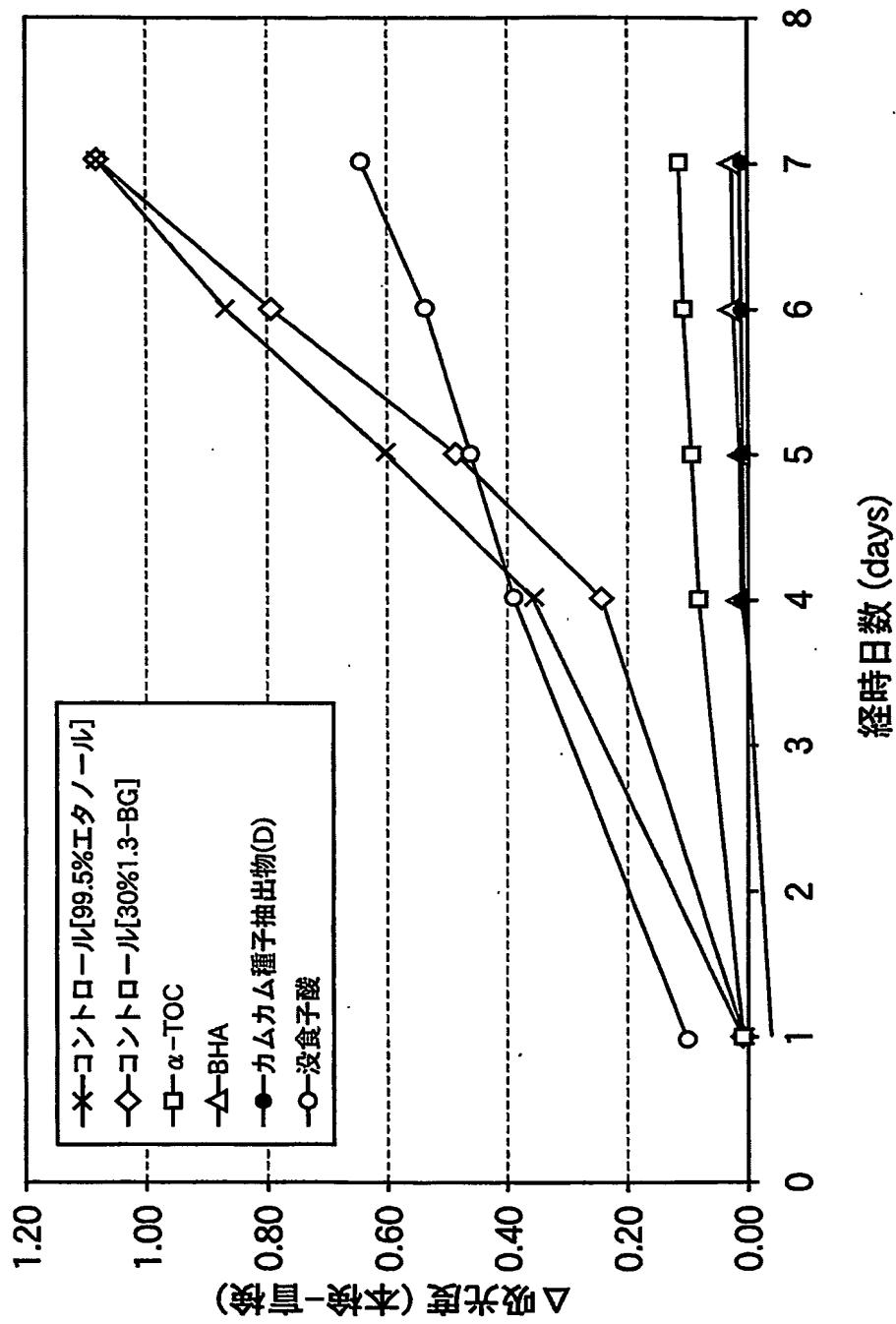
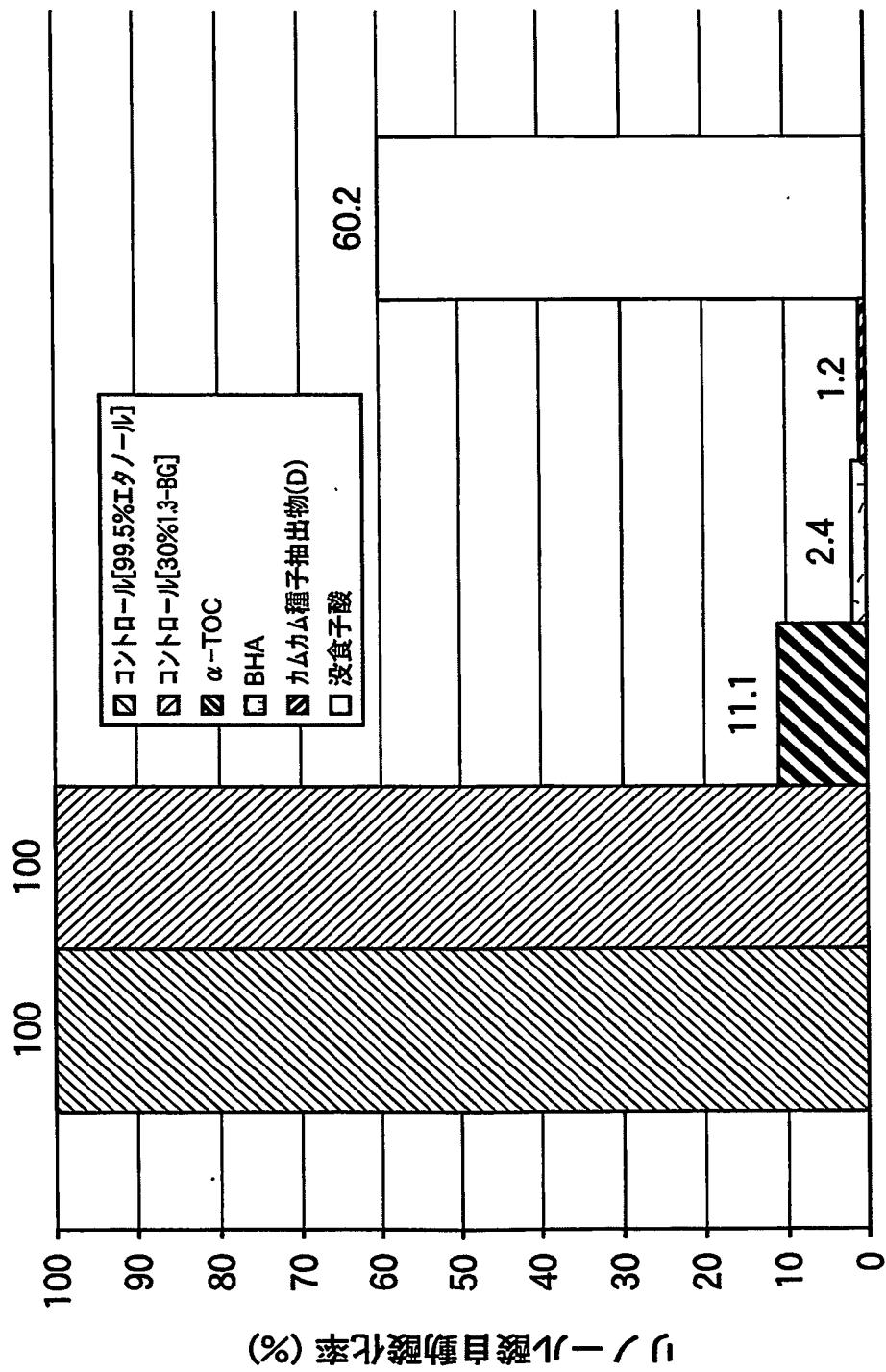


図4

&lt;リノール酸自動酸化率：0.02%区分(7日目)&gt;



5/8

図5

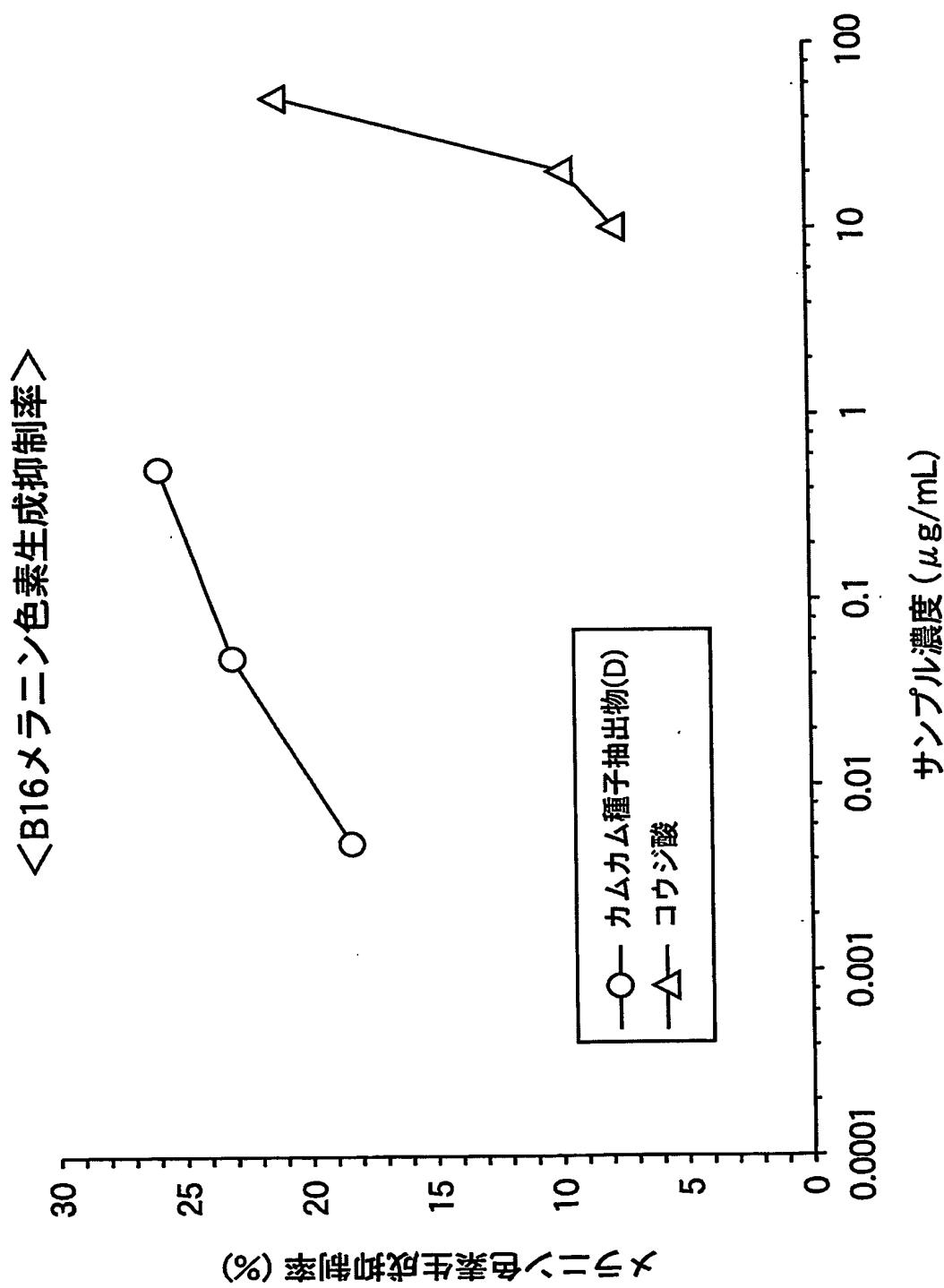


図6

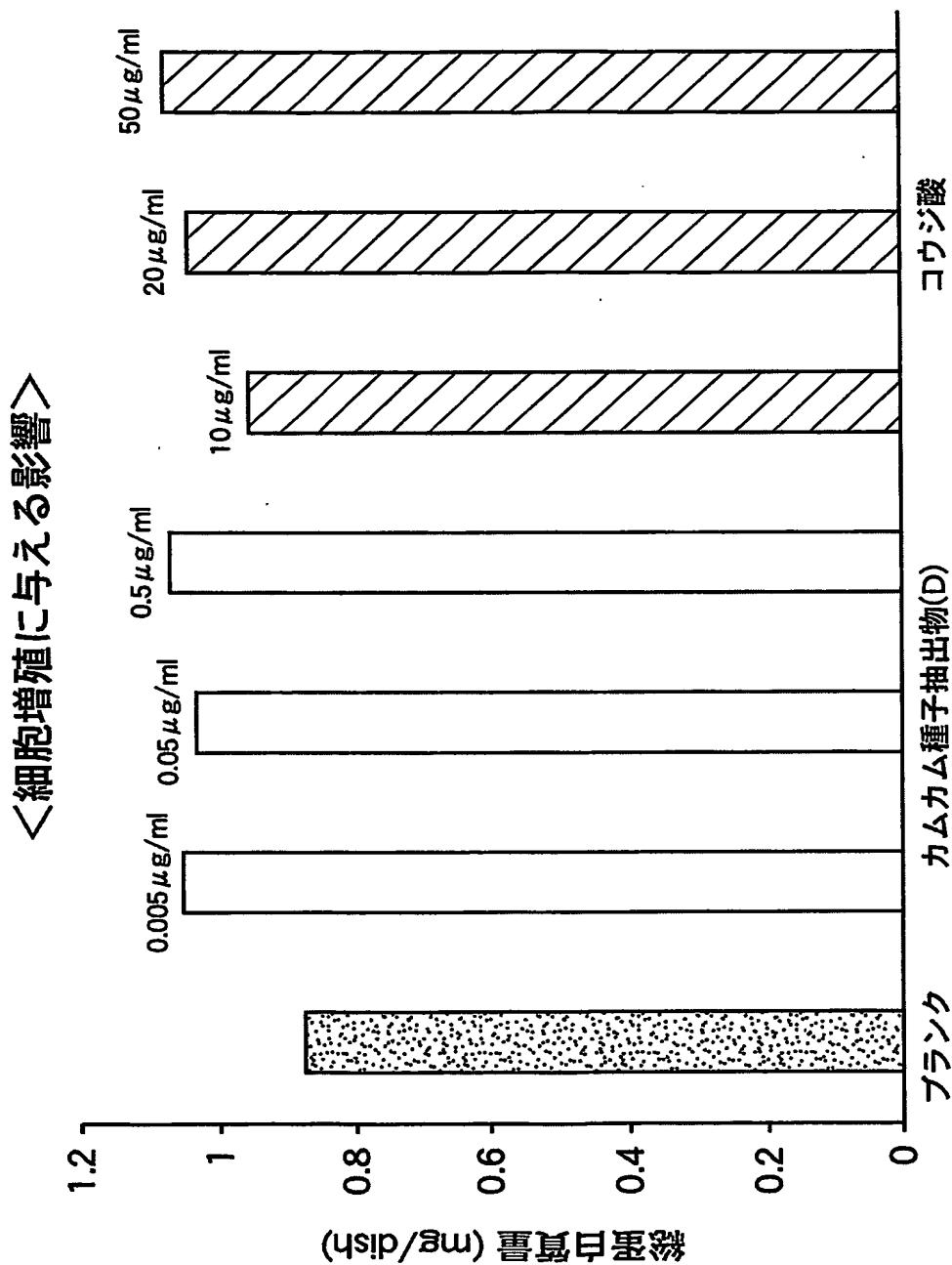
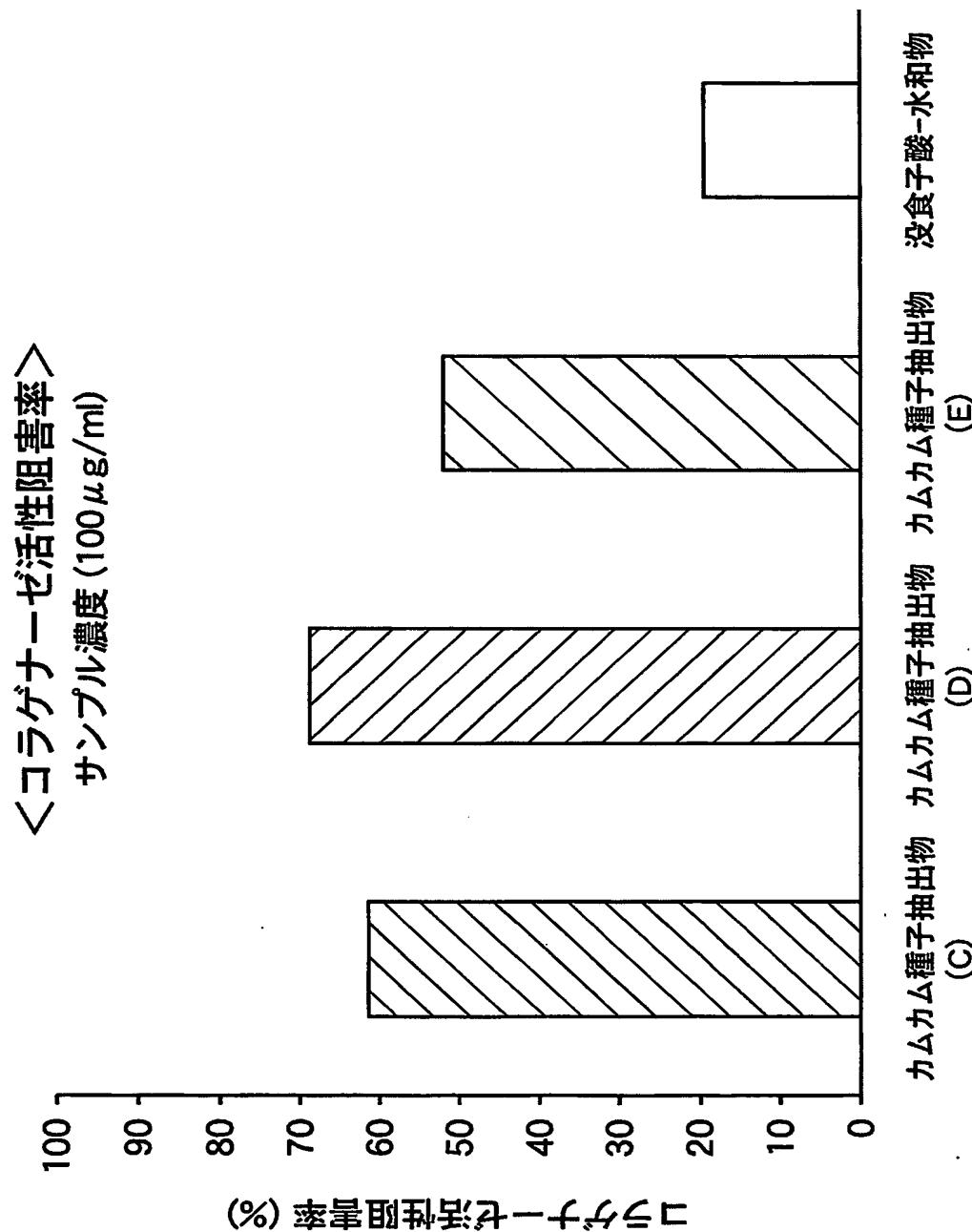
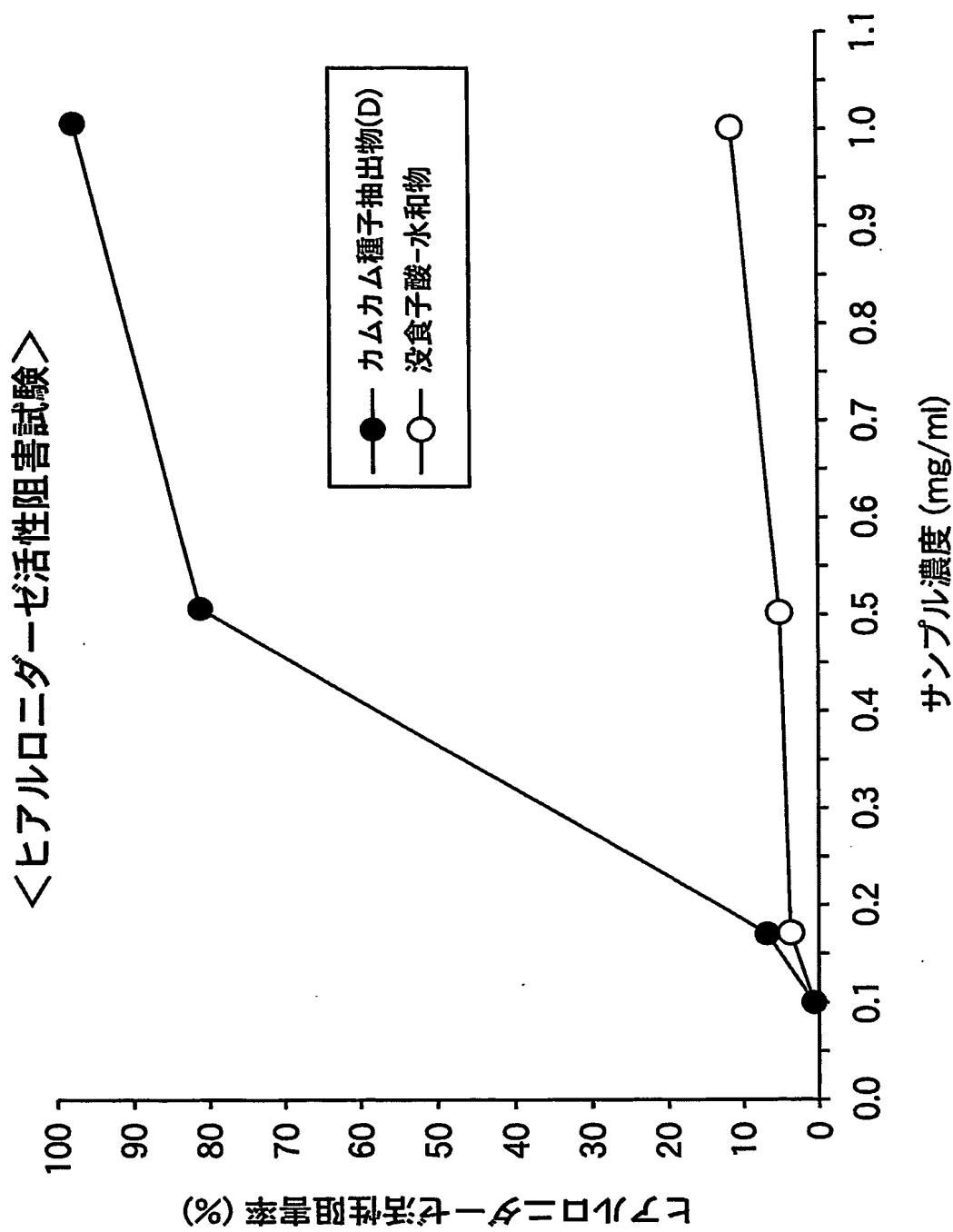


図7



8/8

図8



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP03/15656

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
Int.Cl<sup>7</sup> A61K7/00, 7/48, 35/78, A61P17/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> A61K7/00-7/50, 35/78, A61P17/00, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2000-319154 A (Nippon Menard Cosmetic Co., Ltd.), 21 November, 2000 (21.11.00), Claims (Family: none)	1-4
A	JP 9-221429 A (T. Hasegawa Co., Ltd.), 26 August, 1997 (26.08.97), Claims (Family: none)	1-4
A	JP 11-246336 A (Ichimaru Pharcos Co., Ltd.), 14 September, 1999 (14.09.99), Claims (Family: none)	1-4

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

• Special categories of cited documents:	
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“B” earlier document but published on or after the international filing date	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
03 March, 2004 (03.03.04)

Date of mailing of the international search report  
23 March, 2004 (23.03.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Faxsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP03/15656

**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 435556 A1 (ASAMA CHEM. CO., LTD.), 03 July, 1991 (03.07.91), Claims & JP 3-193713 A & CA 2031760 A	1-4
A	JP 2000-327549 A (Nichirei Corp.), 28 November, 2000 (28.11.00), Claims (Family: none)	1-4

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1' A61K7/00, 7/48, 35/78, A61P17/00, 43/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1' A61K7/00-7/50, 35/78, A61P17/00, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2000-319154 A (日本メナード化粧品株式会社) 2000.11.21 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-4
A	JP 9-221429 A (長谷川香料株式会社) 1997.08.26 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-4

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

2004.03.03

## 国際調査報告の発送日

23.3.2004

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

岡崎 美穂

4C 9166



電話番号 03-3581-1101 内線 3402

C (続き)	関連すると認められる文献	関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	JP 11-246336 A (一丸ファルコス株式会社) 1999.09.14 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-4
A	EP 435556 A1 (ASAMA CHEM CO LTD) 1991.07.03 Claim & JP 3-193713 A & CA 2031760 A	1-4
A	JP 2000-327549 A (株式会社ニチレイ) 2000.11.28 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-4